云 南 植 物 研 究 2009, 31 (1): 75～81
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724 SP.J.1143.2009.08142

TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测水稻 *RAc*1 基因 mRNA 方法的建立

高 东，王云月，何霞红，李成云，朱有勇
(云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程研究中心，农业生物多样性和控制病虫害
教育部重点实验室，云南省植物病理重点实验室，云南 昆明 650201)

摘要：构建包含 *RAc*1 基因 cDNA 片段的质粒，作为水稻肌动蛋白基因 *RAc*1 之 mRNA 定量检测的标准品，建立检测方法，为水稻其他基因的定量建立内参。从水稻叶总 RNA 中逆转录扩增总 cDNA，PCR 扩增 *RAc*1 基因中设计的目的片段，将纯化的目的片段与 pMD19-T Simple 载体进行连接，转化宿主菌 JM-109，提取重组质粒 DNA，PCR 鉴定并测序分析。纯化质粒并检测 260 nm 吸光值，确定重组质粒原液的拷贝浓度并以此制备荧光定量 PCR 梯度浓度标准品，进行实时荧光定量 PCR 实验。建立了 *RAc*1 基因 mRNA 表达实时荧光定量 PCR 检测方法，特异性好，检测灵敏度达 10^2 拷贝，线性范围为 10^2～10^7 拷贝，阈值循环数 (Ct) 与 PCR 体系中起始模板量的对数值之间有着良好的线性关系 ($r = 1.000$)，扩增效率高 ($E = 98.2\%$)。建立了基因 *RAc*1 实时定量 PCR 的质粒标准品。

关键词：水稻；肌动蛋白；基因表达；实时定量 RT-PCR；TaqMan 探针

中图分类号：Q 943.2 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700 (2009) 01-075-07

Establishment of Real-time TaqMan-Fluorescence Quantitative RT-PCR Assay for Detection and Quantification of mRNA Expression of *RAc*1 of Rice

GAO Dong, WANG Yun-Yue, HE Xia-Hong, LI Cheng-Yun, ZHU You-Yong**
(*The National Center for Agricultural Biodiversity*, *Ministry of Education Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Plant Disease Management*, *Key laboratory of Plant Pathology*, *Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China)

Abstract: The cDNA was cloned as the standard for real-time quantifying mRNA of *RAc*1 of rice and the TaqMan fluorescence quantitative PCR assay for detecting *RAc*1 gene expression was established as internal control gene for detecting other gene expression of rice. Total RNA extracted from leaf of rice was reverse transcribed to cDNA. The prospective amplicon was amplified and purified, then was ligated with pMD19-T Simple vector and transformed into bacterium JM-109. Plasmid DNA extracted from positive clones were verified by PCR amplification and sequenced. The concentration of purified DNA template was detected by analyzing absorbance in 260 nm and then the combined plasmid was diluted to series as standard for FQ-PCR. *RAc*1 was amplified by real-time fluorescence quantitative PCR from the plasmid DNA. The method of *RAc*1 mRNA real-time PCR was well established, which detected as low as 10^2 copies with the linear range from 10^2 to 10^7 copies. The standard curves showed high correlations ($r = 1.000$) and PCR efficiency ($E = 98.2\%$). A series of standards for real-time PCR analysis had been constructed successfully, and real-time TaqMan-Fluorescence Quantitative RT-PCR was reliable to quantitatively evaluate mRNA of *RAc*1 of rice. Furthermore, *RAc*1 gene as the internal control gene for detecting

---

基金项目：国家 973 计划项目 (2006CB100200)

通讯作者：Author for correspondence; E-mail: yppl@public.km.yn.cn; Tel: +86-871-5227872

收稿日期：2008-07-19，2008-10-08 接受发表

作者简介：高东 (1978-) 男，在读博士研究生，从事遗传多样性控制作物病害及种质资源持续保护利用等工作。

other gene expression of rice .

Key words: Rice; Actin; Gene expression; Real-time RT-PCR; TaqMan probe

水稻是单子叶植物的模式生物，因此，水稻诸多基因表达量的研究就显得尤为重要。弄清楚各基因的表达情况，对提高作物的产量具有重要的意义。*RAc*1 是水稻的一个肌动蛋白基因，其在水稻不同类型的细胞和组织内中度、稳定表达，而且其表达量近似，无显著性差别；表达水平与细胞周期以及细胞是否活化无关；不受任何内源性或外源性因素的影响（McElroy 等，1990）。正确选择内参基因，很大程度上依赖于所研究的细胞或组织，而寻找适合各自实验系统的特异性稳定表达的内参基因尤为重要（Lossos 等，2003；Radonic 等，2004）。

实时荧光定量 PCR（fluorescence quantitative PCR，FQ-PCR）技术是近几年开发成功的准确的基因定量方法，与 Northern 印迹法、斑点印迹法相比，具有准确、敏感、简便等特点（Orlando 等，1998；阳成波等，2003；欧阳松应等，2004）。其中 TaqMan 荧光探针法引入了特异性的探针，利用 Taq 酶的 5′→3′核酸外切酶活性使报告基团和淬灭基团分离，进而实时监测荧光信号。TaqMan 探针法可避免非特异产物产生荧光信号，克服了荧光染料 SYBR Green I 在此问题上的缺陷，使得检测结果更为准确（Holland 等，1991）。本研究旨在通过 T-A 克隆法克隆水稻肌动蛋白基因 *RAc*1 的目的片段 cDNA，为 *RAc*1 基因的 mRNA 实时荧光定量检测提供质粒标准品，可作为水稻其他基因定量检测的内标。

1　材料与方法

1.1　材料

多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒（北京百泰克生物技术有限公司）；RT-PCR 体系（Invtrogen SuperScript^{TM} III First-Strand Synthesis System for RT-PCR）；多功能 DNA 纯化回收试剂盒（北京百泰克生物技术有限公司）；TaKaRa EX Taq（DRR100A）、dNTP Mixture（各 2.5 mmol L）、DL2000 DNA marker、pMD19-T Simple 载体系统试剂盒（D102A）、感受态细胞 JM-109（D9052）、Amp、X-Gal、IPTG、Premix Ex Taq^{TM}（DRR039）均购自宝生物工程（大连）有限公司；小量质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司；梯度 PCR 仪 Eppendorf 5333 PCR Mastercycler Gradiet（德国）；实时荧光定量 PCR 仪 iCycler iQ^{TM}（伯乐），紫外凝胶分析系统（伯乐）；GeneAmp Sequence Detector 5700、Sequence Detection System 为 Applied Biosystems 公司产品。

1.2　引物、探针的设计与合成

根据 *RAc*1 基因的 GenBank Accession（X16280）在 GenBank 中查找其序列，用 Primer Express Versions 2.0 设计 *RAc*1 的 TaqMan 引物及探针，并通过 NCBI 中的 Blast 功能，初步检测引物和探针的特异性。引物及探针序列：上游引物：5′-TGGTATGGTCAAGGCTGGGT-3′；下游引物：5′-CGACGTAGGCGTCCTTCTG-3′；TaqMan 荧光探针序列：5′-(FAM) CCCTCGCCACACCGGTGTCA（TAMRA）-3′。引物及探针由中国科学院上海闪晶分子生物科技有限公司合成。

1.3　方法

1.3.1　RNA 的提取及纯化　按试剂盒说明提取水稻叶的总 RNA，加 30 μl DEPC 处理水溶解沉淀，琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量，-80℃保存备用。

1.3.2　逆转录反应（RT）　用 Invtrogen SuperScript^{TM} III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit 进行逆转录反应。使用前混匀、短暂离心各组分。配制 RNA、引物混合体系：2 μl 的 Total RNA，1 μl 的 50 μmol L oligo (dT) 20，1 μl 的 10 mmol L dNTP mix，6 μl 的 DEPC-treated water，65℃温育 5 min，迅速放于冰中至少 1 min；配置 cDNA 合成混合体系：2 μl 的 10×RT buffer，4 μl 的 25 mmol L MgCl$_2$，2 μl 的 0.1 mol L DTT，1 μl 的 RNaseOUTTM，1 μl 的 SuperScript^{TM} III RT；将 10 μl cDNA 合成混合体系加到 RNA、引物混合体系中，离心混匀。50℃温育 50 min。85℃，5 min 终止反应，迅速放于冰中。短暂离心，加入 1 μl 的 RNaseH，37℃温育 20 min。-20℃保存或立即用于 PCR。

1.3.3　PCR 扩增　20 μl 的扩增反应体系中：13.5 μl ddH$_2$O；2 μl 10 Ex Taq Buffer (Mg^{2+} Plus)；1.6 μl 2.5 mmol L 的 dNTPs；0.4 μl Forward Primer；0.4 μl Reverse Primer；0.1 μl TaKaRa Ex Taq（5 U μl）；2 μl cDNA。扩增参数为：95℃，预变性 10 min，95℃变性 30 s，60℃退火 30 s，共 40 个循环；72℃延伸 3 min。

1.3.4　*RAc*1 PCR 产物的纯化　配制 1% 琼脂糖凝胶，取 20 μl PCR 产物与 4 μl 6×载样缓冲液混合，5 V cm 电泳 30 min 左右。在长波紫外灯下用干净刀片切下含 122 bp 条带的胶块，尽量切除不含 DNA 的凝胶，得到的凝胶越小越好。将切下含 DNA 的凝胶放入 1.5 ml 的离心管，称出含 DNA 的凝胶重量。按多功能 DNA 纯化回收试剂盒使用说明书纯化 PCR 产物。

1.3.5　*RAc*1 cDNA 目的片段与 pMD19-T Simple 载体的连接　在微量 PCR 管中配制下列组份，全量为 10 μl。5 μl Ligation Mix（使用前冰中融化充分振荡混匀）、1 μl pMD19-T Simple Vector、1 μl 目的片断（约 0.2 pmol）、3 μl ddH_2O，16℃连接反应 30 min。

1.3.6　转化　全量 10 μl 加入至 100 μl JM-109 感受态细胞（使用前冰中融化）中，冰中放置 30 min。42℃加热 45 s 后，再在冰中放置 1 min。加入 890 μl SOC 培养基，37℃，150 rpm，振荡培养 60 min。涂布于含有 X-Gal（40 mg L）、IPTG（24 mg L）、Amp（100 mg L）的 LB - 琼脂平板培养基上，将平板倒置于 37℃培养箱中过夜培养，形成单菌落。

1.3.7　小量培养细菌　挑 1 个蓝色菌落，4 个白色菌落（选择菌落小的），各接种于含 3 ml LB、3 μl Amp 培养基的试管里，37℃，220 r min，摇床培养 15 h。

1.3.8　重组质粒鉴定　用质粒的引物（5′-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′和 5′-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAG-3′）和 *RAc*1（TaqMan）引物对重组质粒进行 Nest PCR 扩增，观察是否有预期的目的片段。取正确插入目的片断的质粒菌液 1 ml 送华大基因研究中心测序，测序结果经 Blast 进行同源性分析。

1.3.9　重组质粒浓度测定及标准曲线的建立　用质粒提取试剂盒提纯质粒，测定 OD_{260} OD_{280} 分析纯度，备用。根据重组质粒提取物 OD_{260} nm 吸光度，并通过如下公式计算纯化产物原液的浓度。

DNA模板浓度（copies μl）= $[A_{260} \times 0.05 \times 10^{-6}\ g \cdot \mu l^{-1} \times 50$（稀释倍数）　$(660\ g \cdot mol^{-1} \times$ 碱基对数$)] \times 6.02 \times 10^{23}$。其中，1 $OD_{260} = 0.05\ g \cdot L^{-1}$ 双链 DNA；1 对碱基平均分子量 = $660\ g \cdot mol^{-1}$；*RAc*1 重组质粒 2 814 bp；6.02×10^{23} 为阿佛加德罗常数。

制备 10^8 copies μl 数量级的溶液作为标准品原液，贮于 -80℃。将重组质粒标准品原液梯度稀释成 10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1 copies μl 梯度数量级的标准品，进行 *RAc*1 实时荧光定量 PCR 检测，每个样品 3 次重复，根据临界循环数（Threshold cycle，Ct）以及模板起始拷贝数制作标准曲线和标准方程。

1.3.10　实时荧光定量 PCR 检测　*RAc*1 mRNA 在荧光定量 PCR 仪上扩增并检测荧光。25.0 μl PCR 反应液包括：8.5 μl ddH_2O、上下游引物各 0.5 μl（10 μmol L）、1.0 μl TaqMan 水解探针（10 μmol L）、12.5 μl premix Ex Taq（2×）和 2.0 μl cDNA。扩增参数为：95℃，预变性 10 s；95℃变性 30 s；59℃，退火 30 s，收集荧光，循环 42 次。

2　结果与分析

2.1　水稻叶总 RNA

提取的总 RNA 有清晰、完整的 2 条带，OD_{260} OD_{280} 值为 1.9 左右，符合试验纯度和逆转录要求（结果未列出）。

2.2　阳性质粒的 PCR 扩增鉴定

提取质粒 DNA 质量高（图 1：C）。以重组质粒 DNA 作模板，用质粒引物和 *RAc*1（TaqMan）

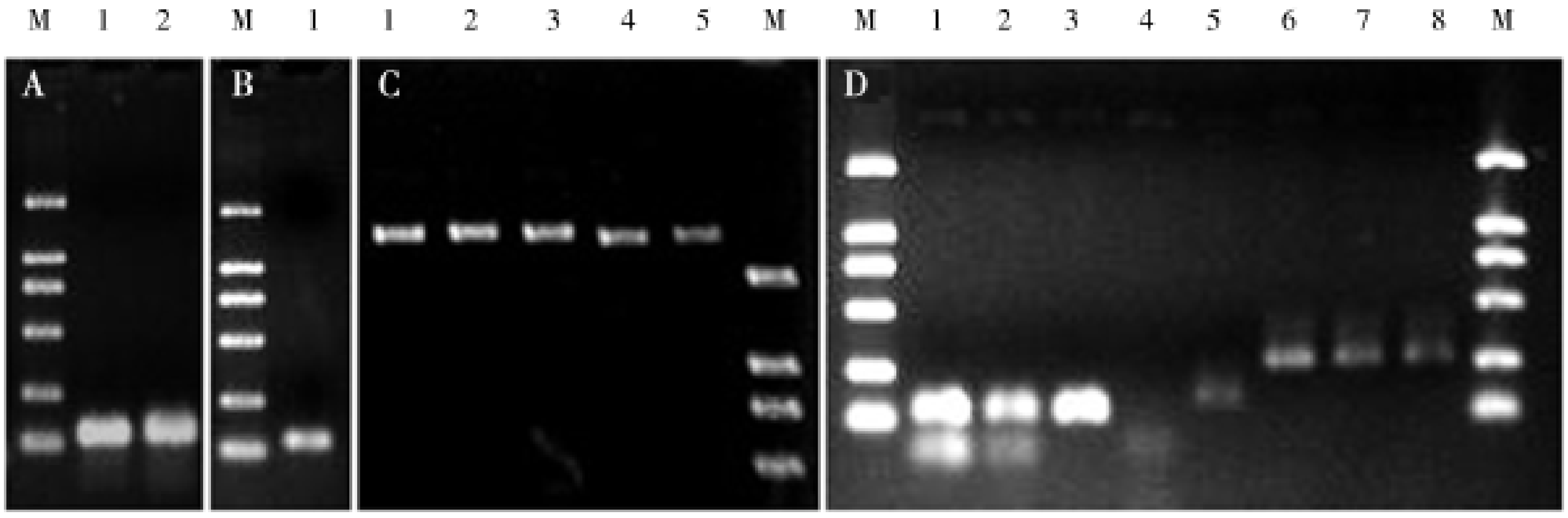


图 1　重组质粒的 PCR 鉴定（M 是 DL2000 markers）

A. 以 cDNA PCR 得到的 *RAc*1 目的片断 1.5%琼脂糖电泳图，1、2 泳道均为目的片段；B. 割胶回收纯化得到的 *RAc*1 目的片断 1.5%琼脂糖电泳图，1 泳道为纯化目的片段，C. *RAc*1 克隆质粒 0.8%琼脂糖电泳图，前 4 泳道为白斑，5 为蓝斑；D. 用 *RAc*1 引物和 pMD19-T 自身引物 Nest PCR 抽提到质粒的 1.5%琼脂糖电泳图，1、2、3 泳道是白菌落质粒 *RAc*1 引物的 PCR 产物，4 为蓝菌落，分别对应的 8、7、6、5 泳道是用 pMD19-T 自身引物的 PCR 产物

Fig. 1　Identification of recombinant plasmids by PCR (M are DL2000 markers)

A. Agarose gel electrophoresis (1.5%) of the prospective amplicon was amplified from the cDNA, 1 and 2 are the prospective amplicons; B. Agarose gel electrophoresis (1.5%) of the purified prospective amplicon, 1 is the purified prospective amplicon; C. Agarose gel electrophoresis (0.8%) of the combined plasmid, 1-4 are white lawns, 5 is blue lawn; D. Nest PCR combined plasmid by primers of *RAc*1 and pMD19-T, 1-4 are amplicons of primers of *RAc*1, 1-3 are white lawns, 4 is blue lawn; 8-5 are amplicons of primers of pMD19-T, respectively symmetrical to 1-4

引物对重组质粒进行 Nest PCR 扩增。结果显示：*RAc*1 引物对白菌落质粒（1、2、3 泳道）扩增产物与理论值 122 bp 吻合，而对蓝菌落质粒（4 泳道）没有扩增产物（图 1：D）；质粒引物对白菌落质粒（8、7、6 泳道）扩增产物与理论值 278 bp 吻合，而对蓝菌落质粒（5 泳道）扩增产物与理论值 156 bp 也吻合（图 1：D）。同时，阳性质粒的测序鉴定结果显示，插入片段序列与 NCBI 上公布的序列同源性为 100%（图 2）。

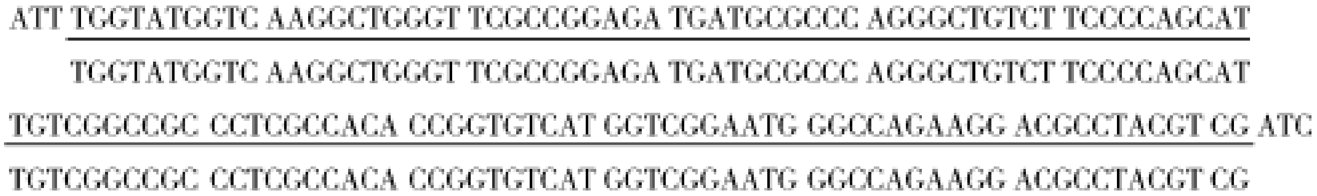
2.3　重组质粒序列分析

用通用引物 M13F-47 和 M13R-48 对重组质粒 DNA 进行双向测序，序列分析结果经 GenBank Blast 比对，与已知 *RAc*1 cDNA 序列相同（图 2）。说明目的片段已成功重组于载体中并保持了序列的完整性。

2.4　标准曲线的建立及线性检测范围

从我们实验得出的常态型扩增曲线（图 3）和对数型扩增曲线（图 4）可以看出：总体看所有曲线拐点清楚，指数期明显，扩增曲线整体平行性好，基线平无上扬现象，低浓度样本扩增曲线指数期明显；曲线指数期斜率大，说明扩增效率高，试剂灵敏度、引物和探针效果好；相邻浓度标准品扩增曲线与曲线之间的间距都十分接近 3.32，是扩增效率都高的表现；低浓度曲线指数期明显，一方面不易出现假阴阳性误判，另一方面说明灵敏度高；扩增曲线的 Ct 值范围都大致在 16～36 范围内，保证了定量准确性。

本研究成功地建立 *RAc*1 基因实时荧光 PCR 定量标准曲线方程（图 5）：$Y = -3.365X + 41.534$，$r = 1.000$，其中 Y 代表 Ct 值，X 代表模



ATT TGGTATGGTC AAGGCTGGGT TCGCCGGAGA TGATGCGCCC AGGGCTGTCT TCCCCAGCAT
TGGTATGGTC AAGGCTGGGT TCGCCGGAGA TGATGCGCCC AGGGCTGTCT TCCCCAGCAT
TGTCGGCCGC CCTCGCCACA CCGGTGTCAT GGTCGGAATG GGCCAGAAGG ACGCCTACGT CG ATC
TGTCGGCCGC CCTCGCCACA CCGGTGTCAT GGTCGGAATG GGCCAGAAGG ACGCCTACGT CG

图 2　重组质粒测序结果及同源性比对（带下划线的序列为测序结果）

Fig. 2　Sequencing result of recombinant plasmids alignment with RAc1 (sequence marked with underline is sequencing result)

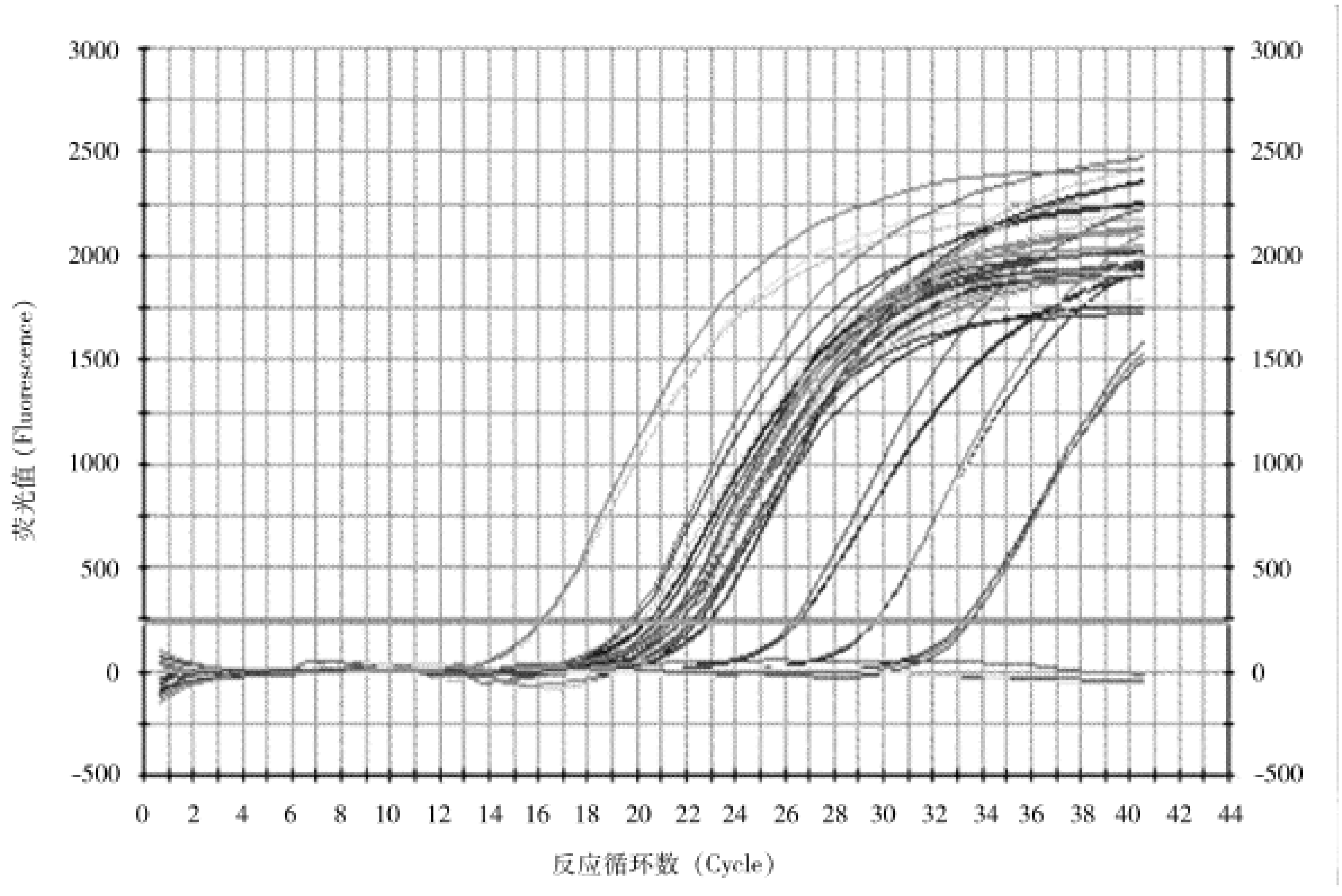


图 3　*RAc*1 基因的实时荧光定量 PCR 扩增曲线（常态型）

Fig. 3　Real-time fluorescence quantitative amplification curve of *RAc*1 (normal view)

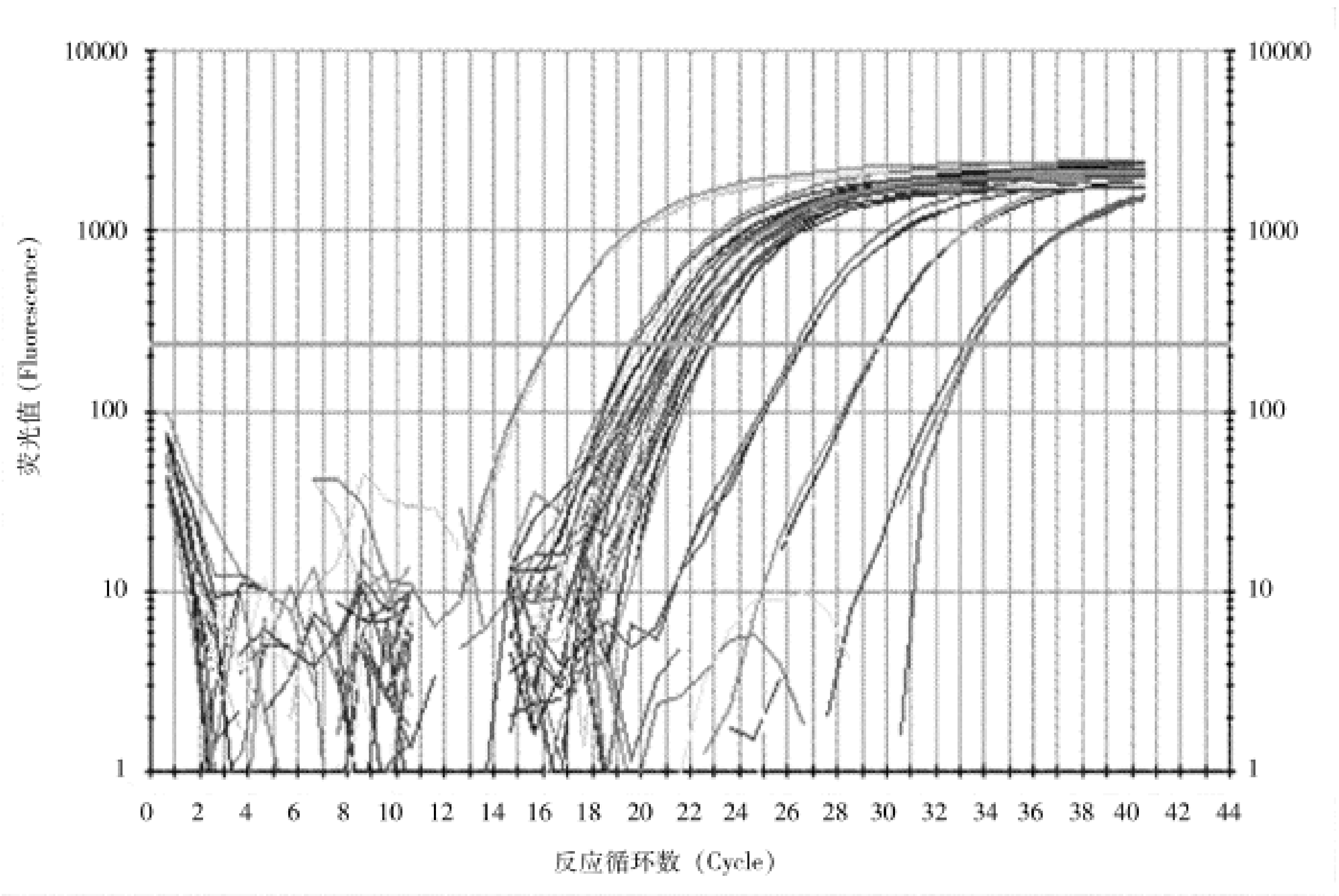


图 4　*RAc*1 基因的实时荧光定量 PCR 扩增曲线（对数态型）

Fig .4　Real-time fluorescence quantitative amplification curve of *RAc*1 (log view)

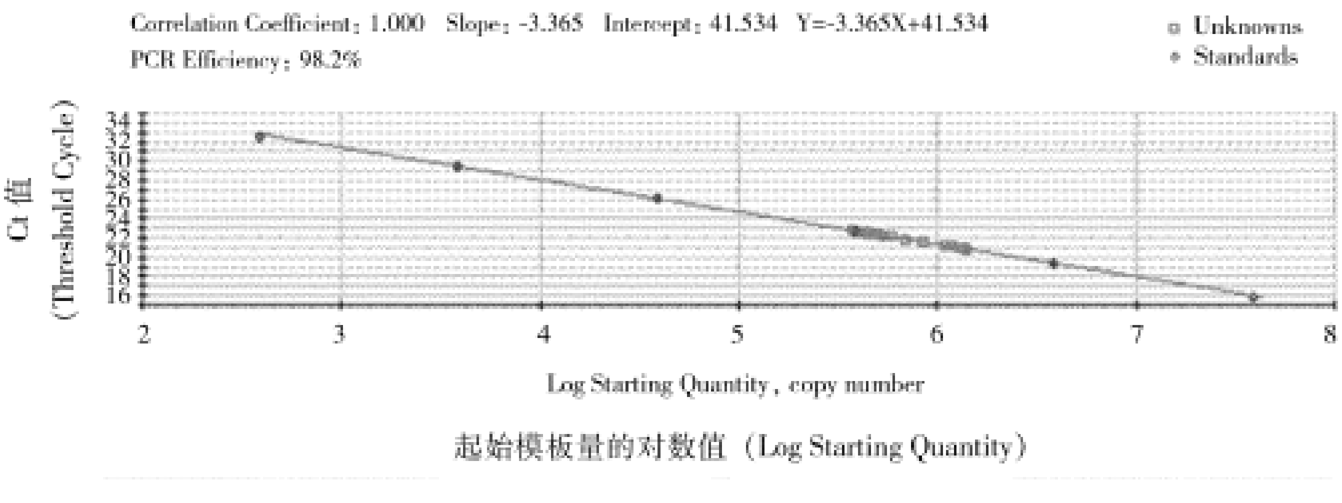


图 5　*RAc*1 基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig .5　Real-time fluorescence quantitative standard curve of *RAc*1

板量的对数值。其线性范围可达 6 个数量级，Ct 值和起始模板拷贝数的相关性均较好（r = 1.000），标准曲线的斜率接近理想值 -3.320，扩增效率为 98.2%。

2.5　标准品的重复性和灵敏度

将系列稀释的标准品各浓度梯度用荧光定量 PCR 重复测定，批内、批间各 5 次，每次每个稀释度重复 3 管，结果（表 1）显示批内和批间重复性均较好。批内变异系数（CV）为：0.10%～0.28%；批间变异系数为：0.14%～0.31%。结果显示相同样本不论其稀释度如何，Ct 值都具有良好的重现性，并且 CV 值都很小，说明同一样本的扩增效率在批内、批间都是比较一致的。

我们建立的克隆质粒标准品检测范围宽、灵敏度高，10^2 数量级拷贝数的初始模板也可准确检测到，定量结果可靠。

3　讨论

mRNA 表达检测成为许多学者所关注的问题之一，经常采用 Northern 印迹法、半定量 RT-PCR

表 1　*RAc*1 标准品的批内和批间重复性

Table 1　The fidelity intra- and inter-batch of *RAc*1

*RAc*1 标准品 gradient *RAc*1 (copies 2 μl)	批内重复性 intra-batch			批间重复性 inter-batch		
	Ct (mean)	SD	CV (%)	Ct (mean)	SD	CV (%)
3.82×10^7	15.96	0.043	0.27	16.02	0.050	0.31
3.82×10^6	19.35	0.025	0.13	19.40	0.030	0.15
3.82×10^5	22.77	0.028	0.12	22.71	0.032	0.14
3.82×10^4	26.22	0.026	0.10	26.25	0.036	0.14
3.82×10^3	29.50	0.029	0.10	29.54	0.040	0.14
3.82×10^2	32.66	0.091	0.28	32.70	0.098	0.30

及竞争性 RT-PCR 等（Ladu 等，1991；Ranganathan 等，1995；Kratky 等，2001；Esenabhalu 等，2002；高勤学等，2004）。近年出现的荧光定量 PCR，具有很高的灵敏度和非常好的动力学检测范围（Giulietti 等，2001；Alkan 等，2006；杨凤秋和朱正歌，2006），其中 TaqMan 探针法的原理是设计一条能与 PCR 产物特异杂交的探针，该探针的 5′端标记荧光报告基团 FAM，3′端标记荧光淬灭基团。探针在无特异性 PCR 发生时，检测不到荧光信号；当有特异性 PCR 扩增发生时，探针与模板结合，激活 Taq 酶的 5′外切酶活性，将探针 5′端连接的荧光分子从探针上切割下来，引起报告基团荧光信号的增长（Stryer，1978；Cardullo 等，1988；Bustin 等，2000）。荧光信号强度与探针和特异性片段的结合数成正相关；循环阈值与 PCR 体系中起始 DNA 量的对数值之间有严格的线性关系，因此根据样品的循环阈值参照标准曲线，经计算机处理后可准确计算出标本内目标基因的拷贝数（Heid 等，1996；杨建荣和陈晓东，2002；王梁燕等，2004）。许多研究证明 TaqMan 荧光定量比 Northern 印迹法灵敏，且与半定量 RT-PCR 及竞争性 RT-PCR 相比更为灵敏、省力（Bonnet 等，2000）。应用荧光定量 RT-PCR 技术检测水稻农艺性状相关基因表达鲜见报道。

本研究选择 TaqMan 荧光探针法对水稻 *actin* 基因 *RAc*1 的 mRNA 表达进行定量检测。考虑到 mRNA 的易降解性可能导致标准品的不稳定从而引起结果的不准确，笔者采用 T-A 克隆法，克隆 *RAc*1 cDNA 重组质粒 DNA 作为标准品制备法（Bielefeldt-Ohmann and Fitzpatrick，1997），所设计引物及探针序列特异，扩增测序显示与 NCBI 公布的序列同源性为 100%。经反应条件优化，成功地建立了优化的标准曲线。靶基因 *RAc*1 标准曲线方程为：$Y = -3.365X + 41.534$，其线性范围可达 6 个数量级，扩增效率高，Ct 值和起始模板拷贝数具有良好的相关性。在进行样本检测时，先进行逆转录，再与标准品同时进行 PCR，从而达到绝对定量目的。

Actin 基因是常用的基因表达定量内对照基因，建立一套优质的内对照基因标准品能很好的消除取样和提取效率不同带来的系统误差，是其他基因准确定量的基础。本研究为进行其他基因的准确定量提供了可靠、准确的方法。

标准曲线的斜率及相关系数显示，本研究建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 法能够准确检测基因 *RAc*1 的 mRNA 表达量，与传统检测方法相比更为迅速、准确、灵敏。

致谢　朱书生、陆春明老师在实验中给予大力帮助。

〔参 考 文 献〕

Alkan N，Gadkar V，Yarden O *et al.*，2006. Analysis of quantitative interactions between two species of arbuscular mycorrhizal fungi，*Glomus mosseae* and *G. intraradices*，by real-time PCR［J］. *Applied and Environmental Microbiology*，72（6）：4192—4199

Bielefeldt-Ohmann H，Fitzpatrick DR，1997. High-efficiency T-vector cloning of PCR products by forced A tagging and post-ligation restriction enzyme digestion［J］. *Biotechniques*，23（5）：822—826

Bonnet M，Leroux C，Faulconnier Y *et al.*，2000. Lipoprotein lipase activity and mRNA are up-regulated by refeeding in adipose tissue and cardiac muscle of sheep［J］. *The Journal of Nutrition*，130（4）：749—756

Bustin SA，2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays［J］. *Molecular Endocrinology*，25（2）：169—193

Cardullo RA，Agrawal S，Flores C *et al.*，1988. Detection of nucleic ac-

id hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 85 (23): 8790—8794

Esenabhalu VE, Cerimagic M, Malli R *et al.*, 2002. Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase in the vascular system affects vascular reactivity in transgenic mice [J]. *British Journal of Pharmacology*, 135 (1): 143—154

Gao QX (**高勤学**), Li J (**李俊**), Liu HL (**刘红林**) *et al.*, 2004. Comparative study on lipogenic and lipolytic gene expression in intramuscular fat tissue between growing Erhualian and Large White pigs [J]. *Acta Genetica Sinica* (**遗传学报**), 31 (11): 1218—1225

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D *et al.*, 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 25 (4): 386—401

Heid CA, Stevens J, Livak KJ *et al.*, 1996. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Research*, 6 (10): 986—994

Holland PM, Abramson RD, Watson R *et al.*, 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′to 3′exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 88 (16): 7276—7280

Kratky D, Strauss JG, Zechner R, 2001. Tissue-specific activity of lipoprotein lipase in skeletal muscle regulates the expression of uncoupling protein 3 in transgenic mouse models [J]. *The Biochemical Journal*, 355 (3): 647—652

Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK, 1991. Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting [J]. *American Journal of Physiology*, 260 (5): 953—959

Lossos IS, Czerwinski DK, Wechser MA *et al.*, 2003. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies [J]. *Leukemia*, 17 (4): 789—795

McElroy D, Rothenberg M, Wu R, 1990. Structural characterization of a rice actin gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 14 (2): 163—171

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M, 1998. Developments in quantitative PCR [J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 36 (5): 255—269

Ouyang SY (**欧阳松应**), Yang D (**杨冬**), Ouyang HS (**欧阳红生**) *et al.*, 2004. Real-time quantitative PCR and its applications [J]. *Chemistry of Life* (**生命化学**), 24 (1): 74—76

Radonic A, Thulke S, Mackay IM *et al.*, 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313 (4): 856—862

Ranganathan G, Ong JM, Yukht A *et al.*, 1995. Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. Effect of the 3′-untranslated region on translation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (13): 7149—7155

Stryer L, 1978. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 47: 819—846

Wang LY (**王梁燕**), Hong QH (**洪奇华**), Zhang YZ (**张耀洲**), 2004. Real-time quantitative PCR and its applications [J]. *Chinese Journal of Cell Biology* (**细胞生物学杂志**), 26 (1): 62—67

Yang CB (**阳成波**), Yin YL (**印遇龙**), Huang RL (**黄瑞林**) *et al.*, 2003. Principle and metod of real-time RT-PCR [J]. *Immunological Journal* (**免疫学杂志**), 19 (3): 145—150

Yang FQ (**杨凤秋**), Zhu ZG (**朱正歌**), 2006. Real-time quantitative PCR and its applications [J]. *Journal of Biology* (**生物学杂志**), 23 (3): 44—46

Yang JR (**杨建荣**), Chen XD (**陈晓东**), 2002. mRNA quantitative analysis applying Real-time RT-PCR technology [J]. *Chinese Journal of Diagnostics* (**中国实验诊断学**), 6 (3): 192—195